

PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation 6 : G01N 33/571	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/13151 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. April 1997 (10.04.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/04249 (22) Internationales Anmeldedatum: 30. September 1996 (30.09.96) (30) Prioritätsdaten: 195 36 166.0 29. September 1995 (29.09.95) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: KRELL, Siegfried [DE/DE]; Immermannstrasse 15, D-39108 Magdeburg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GERBER, Annegret [DE/DE]; Bruno-Taut-Ring 9, D-39108 Magdeburg (DE). (74) Anwalt: EINSEL, Martin; Jasperallee 1 a, D-38102 Braunschweig (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: BR, JP, MX, RU, TR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>

Best Available Copy

(54) Title: PROCESS AND AGENT FOR DETECTING ANTIBODIES AGAINST TREPONEMA PALLIDUM

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND MITTEL ZUM NACHWEIS VON ANTIKÖRPERN GEGEN TREPONEMA PALLIDUM

(57) Abstract

The invention concerns a process and an agent for detecting antibodies against *Treponema pallidum*. A selection of recombinant antigens is gene-amplified and cloned and these gene-amplified and cloned antigens are then expressed in host vector systems and then purified. The purified antigens are then bound individually or together to a solid phase and the antigens bound to the solid phase are then subjected to a reaction with a material investigated for antibodies. The antibodies bound by the antigen-antibody reaction are then established qualitatively and/or quantitatively from the investigated material by means of a detection system. The detecting agent comprises the 17 kD antigen, the 47 kD antigen and TmpA.

(57) Zusammenfassung

Ein Verfahren und ein Mittel zum Nachweis von Antikörpern gegen *Treponema pallidum* werden vorgeschlagen. Eine Auswahl von rekombinanten Antigenen wird genamplifiziert und kloniert, anschließend werden diese genamplifizierten und klonierten Antigene in Wirtsvektorsystemen exprimiert und dann gereinigt, danach die gereinigten Antigene einzeln oder in Kombination an eine feste Phase gebunden, danach die an die feste Phase gebundenen Antigene einer Reaktion mit einem auf Antikörper hin zu untersuchenden Material ausgesetzt, und danach werden die mittels Antigen-Antikörperreaktion gebundenen Antikörper aus dem zu untersuchenden Material mittels eines Detektionssystems qualitativ und/oder quantitativ festgestellt. Das Mittel zum Nachweis besteht aus dem 17 kD-Antigen, dem 47 kD-Antigen und TmpA.

———— IpN60
 ———— IpN47 (47kD Antigen)
 ———— IpN39(BMP) IpN44.5(TmpA)
 ———— IpN34.5(FloB1) IpN37(FloA)
 ———— IpN29-35(34kD Antigen) IpN33(FloB2)

———— IpN17 (17kD Antigen)
 ———— IpN15 (15kD Antigen)

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LJ	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LX	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

BESCHREIBUNG

Verfahren und Mittel zum Nachweis von Antikörpern
gegen *Treponema pallidum*

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und ein Mittel zum Nachweis von Antikörpern gegen *Treponema pallidum*.

Treponema pallidum ist der Erreger der Syphilis. Eine Diagnosestellung für Infektionen mit diesem Krankheitserreger ist nicht nur in Verdachtsfällen wichtig; von großer Bedeutung ist es, eine Syphilis zum einen bei Schwangeren und zum anderen bei Blutspendern auszuschließen. In der Schwangerenvorsorge dient dies der Prävention einer konnatalen Syphilis, also der Übertragung der Syphilis auf das Neugeborene und dessen möglicher Schädigung. Bei Blutspendern ist eine negative Syphilisserologie ein Spenderauswahlkriterium.

Die Syphilisdiagnostik erfolgt in erster Linie serologisch, d.h. durch den Nachweis von Antikörpern gegen *Treponema pallidum* und/oder Cardiolipin. Bereits 14 Tage nach Infektion sind spezifische IgM- und spätestens 4 Wochen nach Infektion IgG-Antikörper nachweisbar. Nur in der davorliegenden Zeit ist direkter Erregernachweis aus dem infizierten Gewebe des Primäraffektes ein weiteres entscheidendes diagnostisches Kriterium.

Eine Diagnosestellung durch kulturellen Nachweis, wie sonst für viele andere bakterielle Krankheitserreger üblich, ist nicht möglich, da eine *in vitro*-Kultur von *Treponema pallidum* bisher nicht gelungen ist, abgesehen von einer Passagierung auf Zellkulturen (US-PS 5,264,360).

Die Nachweismethoden für die serologische Diagnostik lassen sich nach der Natur der nachgewiesenen Antikörper in drei Gruppen einteilen:

1. Nicht-Treponemen-spezifische Tests. Auf dem Nachweis von Antikörpern gegen Cardiolipin basieren Tests wie der Cardiolipin- Mikroflockungstest (CMT),

- der im englischsprachigen Raum als Veneral Disease Laboratory Test (VDRL-Test) bezeichnet wird, der "Rapid Plasma Reagin Test" (RPR-Test) und die Cardiolipin-Komplementbindungsreaktion (Cardiolipin-KBR). Diese Tests werden 3-5 Wochen nach Infektion bzw. etwa 7-10 Tage nach Erscheinen des Primäraffektes positiv. Die Sensitivität beträgt 60 bis 87 % im Primärstadium und kann 100 % bei Sekundärsyphilis erreichen. Die Sensitivität fällt jedoch im weiteren Krankheitsverlauf, so daß bis zu 30 % der Spätstadien nicht mehr reaktiv sind. Bei quantitativer Durchführung des VDRL-Tests ist eine Titerabhängigkeit von der Krankheitsaktivität zu verzeichnen. Nachteil dieser Tests ist der hohe Anteil von 0,3-0,9 % falsch positiven Testergebnissen bei Untersuchung von Blutspendern sowie das Vorkommen falsch negativer Ergebnisse bei hochtitrigen Seren infolge Prozonophänomens, das bei Sekundärsyphilis im VDRL-Test in 1 bis 2 % der Fälle beobachtet werden kann.
- 15 2. *Treponemen-spezifische Tests*. Im Verlauf der Syphilis werden gegen Endoflagellen von *Treponema pallidum* Antikörper gebildet. Auf Grund von Antigenverwandtschaften reagieren diese Antikörper auch mit Endoflagellen anderer *Treponemenspecies*. Für die Syphilisdiagnostik wurden deshalb auch Endoflagellen von *Treponema phagedenis* (Biotyp Reiter) als Antigen eingesetzt (Flagellum-ELISA, R. V. W. Van Eijk et al., Genitourin. Med. 62, 367-372 (1988)). Beim Flagellum-ELISA stellt der Grenzwert für ein positives Testergebnis einen Kompromiß bezüglich Sensitivität und Spezifität dar. Damit sind 0,8 % falsch positive und 2,7 % falsch negative Testergebnisse zu verzeichnen.
- 25 3. *Treponema-pallidum-spezifische Tests*. Diese Tests weisen Antikörper nach, die mit *Treponema pallidum* oder Antigenpräparationen aus dem Erreger reagieren. Zu diesen Testsystemen gehören der *Treponema-pallidum*-Hämagglutinationstest (TPHA) der Fluoreszenz-*Treponema-pallidum*-Antikörper-Absorptionstest (FTA-ABS) und der Nelson-Test (*Treponema pallidum*-Immobilisationstest, TPI) sowie ELISA-Systeme auf der Basis von Sonikatantigen. In der Diagnostik werden vorrangig TPHA und FTA-ABS eingesetzt.
- 30

Beim Nelson-Test wird mikroskopisch beurteilt, wie komplementaktivierende Antikörper im Patientenserum die Beweglichkeit von *Treponema pallidum* hemmen. Der Nelson-Test wird wegen des hohen Aufwandes fast nur noch zu wissenschaftlichen Fragestellungen eingesetzt.

5

Beim TPHA werden Erythrozyten, an die *Treponema pallidum*-Sonikatantigen gebunden ist, durch Antikörper aus Syphilispatientenseren agglutiniert. Der TPHA weist mit 0,07 % falsch positiven und 0,008 % falsch negativen Ergebnissen eine hohe Spezifität und Sensitivität auf, wobei die meisten falsch negativen Ergebnisse die Frühphase der Syphilis betreffen. Der TPHA wird in der 4. Woche der Infektion positiv, zeigt bei Primärsyphilis eine Sensitivität von 64% bis 87 % mit zunächst geringer Titerhöhe (80 - 320), die beim Übergang zur Sekundärsyphilis auf über 5000 bei einer Sensitivität von 100 % ansteigen kann. Im weiteren Verlauf bleibt der TPHA positiv bei einer Tendenz zum Titerabfall im latenten Stadium.

15

Beim FTA-Abs wird die Bindung von spezifischen Antikörpern im Untersuchungsserum an objektträgerfixierte *Treponema pallidum* über einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper in der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen. Die Sensitivität des Nachweises beträgt bei Primärsyphilis 86 % bis 100 %, erreicht bei Sekundärsyphilis 100 % und in den Spätstadien 96 % bis 100 %. Die Sensitivität für alle Stadien liegt verschiedenen Angaben zufolge zwischen 83 % und 95 %. Die Spezifität ist mit 83 % bis 89 % (ohne "borderline"-Befunde) nicht sehr hoch. Isoliert FTA-positive Seren bei negativer übriger Syphilisserologie sind z. B. durch Lyme-Borreliose bedingt. Der FTA-Abs wird als Bestätigungstest zur Absicherung positiver TPHA-Befunde durchgeführt.

20

25

Veldkamp und Visser (Brit. J. Vener. Dis. 51, 227-231 (1975)) beschrieben erstmalig einen ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), bei dem Sonikatantigen von *Treponema pallidum*, das adsorptiv an Festphasen gebunden ist, mit spezifischen Antikörpern aus dem Untersuchungsmaterial reagiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgt durch Reaktion mit einem enzymmarkierten speziesspezifischen Sekundärantikörper gegen Immun-

30

globuline der Klasse IgG bzw. IgM und nachfolgender enzymatischer Farb-
reaktion. Auf diesem Prinzip beruht auch der kommerzielle indirekte En-
zymimmunttest Captia Syphilis G (Mercia Diagnostics, Guildford, England). Für
diesen Test wurde eine Sensitivität von 98,4 % und eine Spezifität von 99,3 %
5 ermittelt (Young et al., J. Clin. Pathol. 45, 37-41, (1992), Genitourin. Med. 65,
72-78 (1989)). Beim Captia Syphilis M wird spezifisches IgM nachgewiesen, das
bereits in der Frühphase der Erkrankung gebildet wird (Sensitivität bei Primär-
syphilis 82 %). Da IgM-Antikörper nicht placentagängig sind, ist dieser Test be-
deutsam für die Diagnostik der konnatalen Syphilis (Sensitivität 100 %, 10
Ijsselmuiden et al., J. Clin. Microbiol. 27, 152-157, (1989)). Das Testprinzip be-
ruht auf einem festphasegebundenen Fangantikörper für IgM aus dem Untersu-
chungsmaterial, wobei spezifische IgM-Antikörper anschließend mit *Treponema*
pallidum-Antigen reagieren. Der Nachweis erfolgt über einen enzymmarkierten
monoklonalen Antikörper gegen Endoflagellen durch nachfolgende en-
15 zymatische Farbreaktion.

Bei dem Syphilis BioEnza Bead Assay (Organon Teknika Corp., USA) ist das
Treponema pallidum-Antigen adsorptiv an ferromagnetische Partikel gebunden.
Die Bindung von Antikörpern aus dem Untersuchungsmaterial wird dann über
20 enzymmarkierten Sekundärantikörper und Farbreaktion nachgewiesen. Sensiti-
vität und Spezifität werden für diesen Test mit 93 % und 98,6 % angegeben
(Burdash et al., J. Clin. Microbiol. 25, 808-811, (1987)).

25 Sonikatantigen, wie vorstehend erwähnt, wird durch mechanische Aufarbeitung
des Erregers mittels Ultraschall gewonnen.

Die oben schon erwähnte mangelnde *in vitro*-Kultivierbarkeit von *Treponema*
pallidum führt natürlich dazu, daß diese Erreger nur sehr schwer zur Verfügung
gestellt werden können.

30 Allgemein anerkannt ist derzeit eine zweistufige Diagnostik der Syphilis. In der
ersten Stufe werden alle Seren mit einem Test untersucht (Screening). In der
zweiten Stufe werden Seren mit positivem Befund mit einem anderen Test-

- system untersucht (Bestätigungstest). Da die Prävalenz der Syphilis in vielen Ländern gering ist ($< 1\%$), reicht eine 99%ige Spezifität des Screeningtests nicht zur Diagnosesicherung aus. Ein positiver Vorhersagewert (predictive value) von über 90 % wird erst mit einem Bestätigungstest, der auf andersartigem
- 5 Nachweisprinzip beruht, erreicht.

- Weit verbreitet ist die Anwendung von TPHA allein oder in Kombination mit VDRL-Test bzw. RPR-Test im Screening und die Prüfung der positiv gefundenen Seren im FTA-ABS als Bestätigungstest.
- 10

- Als Therapiekontrolle ist die quantitative Durchführung von VDRL-Test bzw. RPR-Test anerkannt, wobei ein Titerabfall um mehr als vier Titerstufen als Therapieerfolg gewertet wird.
- 15 Bewertung der gegenwärtigen Syphilisdiagnostik : Nicht-Treponemen-spezifische Tests liefern ca. 5 % falsch positive Resultate. Sie sind daher für die serologische Diagnostik nur als erster Schritt geeignet und müssen bei positivem Ausfall im zweiten Schritt durch *Treponema pallidum*-spezifische Tests ergänzt werden. Da Nicht-Treponemen-spezifische Tests bei quantitativer Auswertung
- 20 eine Korrelation zur Krankheitsaktivität zeigen, können sie zur Erfolgskontrolle antibiotischer Therapie herangezogen werden.

- Falsch positive Testergebnisse bei den treponemenspezifischen Tests sind wegen Antigenverwandtschaft zu Treponemen möglich, die beim Menschen als
- 25 Kommensalen in der Mundschleimhaut vorkommen. Auf Grund der mangelhaften Spezifität und Sensitivität konnten sich diese Testsysteme zur Diagnostik der Syphilis nicht durchsetzen.

- Die *Treponema pallidum*-spezifischen Tests basieren auf Antigenpräparationen
- 30 von *Treponema pallidum*, wobei das verwendete Erregermaterial wegen der mangelnden *in vitro*-Kultivierbarkeit von *Treponema pallidum* aus infizierten Kaninchenhoden gewonnen wird. Das ist mit Fragen des Tierschutzes belastet und nur in geringer Menge möglich. Der FTA-ABS und der Nelson-Test sind in der Durchführung aufwendig und nicht zur Automatisierung geeignet. Da An-

5 tikörper gegen nichtpathogene Treponemen auch bei Gesunden vorkommen und infolge Antigenverwandtschaft mit *Treponema pallidum*-Sonikatantigen Kreuzreaktivität zeigen, erfordert die Verwendung von *Treponema pallidum*-Vollantigen eine Serumabsorption mit Präparationen aus *Treponema phage-*
5 *denis*.

Die ELISA-Systeme auf der Basis von *Treponema pallidum* als Vollantigen erfüllen zwar die Qualitätskriterien in Bezug auf Sensitivität und Spezifität, sind aus Kostengründen jedoch nicht geeignet, die weitverbreitete Zweistufen-
10 diagnostik TPHA, VDRL-Test oder RPR-Test in Kombination mit dem FTA-Abs abzulösen.

15 In der EP 0 391 330 B1 wird bereits festgestellt, daß die auf dem Markt befindlichen Tests den Anforderungen an Screening-Tests nicht entsprechen, auch hinsichtlich des technischen Aufwandes und der Testbewertung. Dort wird vorgeschlagen, dem dadurch entgegenzuwirken, daß die Antigene an eine Festphase gebunden werden, und zwar entweder irreversibel direkt oder über einen nicht immunchemisch bindenden Spacer.

20 Aufgabe der Erfindung ist es demgegenüber, ein Verfahren und ein Mittel zum Nachweis von Antikörpern gegen *Treponema pallidum* vorzuschlagen, die eine Verbesserung dieser Situation erlauben.

25 Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren gelöst, bei dem eine Auswahl von rekombinanten Antigenen genamplifiziert und kloniert wird, anschließend diese genamplifizierten und klonierten Antigene in Wirtsvektorsystemen exprimiert und dann gereinigt werden, danach die gereinigten Antigene einzeln oder in Kombination an eine feste Phase gebunden werden, danach die an die feste Phase gebundenen Antigene einer Reaktion mit einem auf Antikörper hin zu untersuchenden Material ausgesetzt werden, und danach die mittels Antigen-Antikörperreaktion gebundenen Antikörper aus dem zu untersuchenden Material mittels
30 eines Detektionssystems qualitativ und/oder quantitativ festgestellt werden.

Durch ein derartiges Verfahren entsteht erstmals ein hinsichtlich des technischen Aufwandes vertretbares Verfahren, das zugleich im Ergebnis ein erforderliches Höchstmaß an Sensitivität und Spezifität bei der Bestimmung von Antikörpern gegen *Treponema pallidum* liefert.

5

Ein erfindungsgemäßes Mittel aus rekombinanten Antigenen zur Durchführung eines Verfahrens zum Nachweis von Antikörpern gegen *Treponema pallidum* besteht aus 17 kD-Antigen, 47 kD-Antigen und TmpA.

10 Eine Kombination aus diesen drei Antigenen führt zu einer hohen diagnostischen Sensitivität in der serologischen Syphilisdiagnostik. Sie ermöglicht den simultanen Nachweis der Antikörper gegen Antigene, gegen die in allen Stadien der Syphilis hohe Antikörperkonzentrationen zu finden sind.

15 Bevorzugt ist bei bestimmten Anwendungsfällen die Hinzunahme bestimmter rekombinanter Antigene, und zwar entweder einzeln zu den drei vorgenannten oder auch in Gruppen von zwei oder mehr zu den drei vorgenannten. Es handelt sich dabei um BMP, das 34 kD - Antigen, TmpC und Tp4.

20 Eine Hinzunahme dieser rekombinanten Antigene ist in bestimmten Anwendungsfällen bevorzugt, da durch zusätzliche Erfassung von Antikörpern gegen *Treponema-pallidum*-spezifische Epitope dieser rekombinanten Antigene eine weitere Verbesserung der Sensitivität des serologischen Syphilis-nachweises erreicht werden kann.

25

Zur Vermeidung von Spezifitätsverlusten ist die optionale Hinzunahme dieser rekombinanten Antigene an folgende Voraussetzungen gebunden:

1. Unspezifische Bindungen müssen minimiert werden.
2. Kreuzreagierende Antikörper im Untersuchungsmaterial müssen entfernt

30

oder neutralisiert werden, z.B. durch Absorption.

Bei einer kombinierten Verwendung rekombinanter Antigene ist für die jeweilige Ausführungsform sicherzustellen, daß Antikörper gegen jedes einzelne Antigen

einen substantiellen Anteil am detektierten Signal (Extinktionszunahme, Chemilumineszenz, Radioaktivität, Fluoreszenz etc.) hervorrufen.

- 5 Vorschläge zur Klonierung von *Treponema pallidum*-DNA anstelle der mangelnden *in vitro*-Kultivierbarkeit sind zwar schon gemacht worden, allerdings sind dabei keine kommerziell nutzbaren diagnostischen Systeme entstanden, die die Sensitivität und Spezifität der bisherigen Syphilisdiagnostik erreichen konnten. Bekannt sind daher lediglich Spekulationen aus der Literatur, jedoch keine Be-
- 10 richte über Verfahren zur Serodiagnostik der Syphilis unter Anwendung einer Kombination von rekombinanten Antigenen.

- Es stellte sich heraus, daß ein prinzipielles Problem der Serodiagnostik mit Einzelantigenen darin besteht, daß die Höhe der Antikörperspiegel für die einzel-
- 15 nen Antigene sowohl vom Krankheitsstadium abhängt, als auch personenabhängige, individuelle Unterschiede auftreten. Ein kombinierter Antikörpernachweis gegen mehrere diagnostisch relevante Antigene, also eine Auswahl derselben, kann daher die Sensitivität und Spezifität der serologischen Diagnostik steigern.

- 20 In den Unteransprüchen sind weitere bevorzugte, erfindungsgemäße Mittel angegeben.

- Ein weiterer entscheidender Faktor für Testsysteme mit rekombinanten Proteinen ist deren Reinheit. Bei Verwendung von rekombinanten Antigenen aus Expressionssystemen mit *E. coli* ist eine möglichst vollständige Entfernung der Wirtsproteine erforderlich, da sonst natürliche Antikörper gegen dieses Darmbakterium im Testsystem nachgewiesen werden. Die Herstellung der rekombinanten Proteine mit Klonierungsstrategie, Expression und Reinigung der verwendeten rekombinanten
- 25 Proteine ist deshalb von erheblicher Bedeutung für das jeweilige Testverfahren.
- 30

Das erfindungsgemäße Verfahren basiert auf der Reaktion von spezifischen Antikörpern aus insbesondere Körperflüssigkeiten wie Serum, Plasma oder Liquor mit rekombinanten Antigenen von *Treponema pallidum*, die an eine feste

- Phase gebunden sind. Durch spezifische Antigen-Antikörperreaktion gebundene Antikörper werden bevorzugt durch einen sekundären markierten Antikörper nachgewiesen. Dabei sind radioaktive Markierungen, Markierungen mit Fluoreszenzfarbstoffen oder Enzymen möglich. Gemessen wird die gebundene Radioaktivität (Prinzip des Radioimmunassays), die Fluoreszenz (Fluoreszenzimmunoassay), die Enzymaktivität durch Substratfarbreaktion (colorimetrischer Immunoassay) oder Substratreaktion mit Chemilumineszenz (Chemilumineszenzimmunoassay). Exemplarisch vorgestellt werden Verfahren mit colorimetrischem und mit Chemilumineszenznachweis.
- Die Antigene werden durch verschiedene Prinzipien an eine feste Phase gebunden. Mögliche Bindungsprinzipien sind die adsorptive Bindung, kovalente Bindung oder eine Bindung durch Reaktion mit einem bereits festphasegebundenen spezifischen Fangantikörper. Als Trägermaterial können Mikropartikel, Kugeln, Stäbchen, Röhrchen und Mikrottestplatten oder poröse Materialien verwendet werden. Exemplarisch vorgestellt werden Testsysteme mit Mikrottestplatten, an die die Antigene adsorptiv gebunden wurden sowie ein Nachweisverfahren mit kovalenter Bindung der Antigene an paramagnetische Partikel.
- Die Verwendung dieser Verfahren erfolgt zusammen mit einer Auswahl von rekombinanten Antigenen von *Treponema pallidum*. Die Gene für das 17 kD-Antigen, für das 47 kD-Antigen, TmpA, TmpC und BMP, das 34 kD-Antigen und Tp4 wurden aus *Treponema-pallidum*-DNA durch Polymerasekettenreaktion amplifiziert, in den Plasmidvektor pQE-30 inseriert und in *E. coli* M15[pREP4] transformiert. Das verwendete Wirts-Vektorsystem erlaubte eine induzierbare Expression der rekombinanten Proteine mit nachfolgender affinitätschromatographischer Reinigung der rekombinanten Proteine, die dann an die feste Phase gebunden wurden.
- Gegenstand der Erfindung ist weiterhin das Verfahren zur Auswahl der rekombinanten Antigene mit Eignung für die Serodiagnostik der Syphilis durch Prüfung des Antikörpergehaltes in Patientenseren der verschiedenen Stadien und der kombinierte Nachweis von Antikörpern gegen ausgewählte Antigene von *Treponema pallidum*.

Im folgenden werden bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung anhand der beigefügten Figuren beschrieben. Es zeigen

- Figur 1** einen Westernimmunoblot mit dem Antigenprofil von *Treponema pallidum*;
- Figur 2** ein Coomassie-gefärbtes Gel und einen Westernimmunoblot mit rekombinanten Antigenen;
- Figur 3** einen colorimetrischen ELISA zur Abhängigkeit der optischen Dichte und des Positiv/Negativquotienten von der Konjugatverdünnung;
- Figur 4** einen colorimetrischen ELISA zur Abhängigkeit der optischen Dichte von der Serumverdünnung;
- Figur 5** einen Chemilumineszenz-ELISA zur Abhängigkeit der Chemilumineszenz von der Serumverdünnung;
- Figur 6** einen Chemilumineszenz-ELISA zur Ermittlung des Positiv/Negativquotienten in Abhängigkeit von der Serumverdünnung;
- Figur 7** einen colorimetrischen ELISA und einen Chemilumineszenz-ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen *Treponema pallidum* in Patientenseren; und
- Figur 8** einen Chemilumineszenz-ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen *Treponema pallidum* in verschiedenen Syphilisstadien.

5

Anhand der Figuren werden im folgenden beispielhaft Klonierung, Expression und Reinigung der *Treponema pallidum*-Antigene erläutert.

- 10 Für ausgewählte Antigene von *Treponema pallidum* wurde unter Verwendung spezieller Klonierungsprimer eine Genamplifikation durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) an *Treponema pallidum*-DNA durchgeführt. Das resultierende PCR-Produkt wurde durch die Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Sal*I geschnitten und nachfolgend durch Ligation in den *Bam*HI/*Sal*I-geschnittenen Expressions-Plasmidvektor pQE-30 inseriert. Danach wird *E.coli* M15[pREP4]

transformiert. Plasmidvektor und Wirt sind beschrieben in "The QIA-expressionist", herausgegeben von der Qiagen Inc., Chatsworth, CA 91311, U.S.A, von der auch Vektor und Wirt erhältlich sind, ferner wird auf die EP 0 282 042 B1 Bezug genommen.

5

In den so erhaltenen Klonen läßt sich die Expression der rekombinanten Antigene gezielt induzieren. Eine affinitätschromatographische Reinigung wird durch das verwendete Expressionssystem ermöglicht und liefert die rekombinanten Antigene in ausreichender Reinheit für diagnostische Tests.

10

Es folgt eine Vorauswahl starker Immunogene von *Treponema pallidum*. Im Verlauf der Syphilis werden Antikörper gegen eine Vielzahl von *Treponema pallidum*-Proteinen gebildet (Norris, Microbiol. Rev. 57, 750-775 (1993)). Zur Identifizierung starker Immunogene wird ein Westernimmunoblot durchgeführt.

15 Dazu wird Vollantigen von *Treponema pallidum* in der Sodium Dodecylsulfat Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) aufgetrennt und die Proteine auf Nitrozellulose überführt (Westernblot).

Das Ergebnis zeigt Figur 1. Nach Inkubation mit einem Poolserum von Patienten mit Sekundärsyphilis (Bahn 1), mit einem Primärsyphilispatientensserum (Bahn 2) und einem Sekundärsyphilispatientensserum (Bahn 3) gefolgt von Inkubation mit einem Meerrettichperoxidase-konjugierten Antihumanglobulin wurden durch das ECLTM - Detektionssystem (Amersham) immunoreaktive Antigene sichtbar gemacht. Von oben nach unten zeigen die Hinweispeile TpN60, 20 TpN47 (47 kD-Antigen), TpN44,5 (TnpA), TpN39 (BMP), TpN37 (FlaA), TpN34,5 (FlaB1), TpN33 (FlaB2), TpN29-35 (34 kD-Antigen), TpN17 (17 kD-Antigen) und TpN15 (15 kD-Antigen). Die vor den Klammern stehenden Bezeichnungen sind dabei die entsprechend einer neueren von Norris (s.o.) eingeführten Nomenklatur, die in den Klammern entsprechen der vorwiegend angewendeten. 25 30

Dabei zeigten Patientenseren mit aufgetrenntem *Treponema pallidum*-Vollantigen starke Reaktivität mit Banden, die dem 15 kD-Antigen, dem 17 kD-

Antigen, dem 34 kD-Antigen, den Endoflagellenantigenen (FlaB1, FlaB2, FlaA), dem BMP, dem TmpA und dem 47kD-Antigen entsprechen.

- 5 Wegen bekannter Antigenverwandtschaft zu homologen Proteinen anderer *Treponemenspecies* werden Endoflagellenantigene nicht ausgewählt. Die übrigen Antigene werden kloniert und mit Ausnahme des 15 kD-Antigens exprimiert.

- 10 Die Klonierung der *Treponema pallidum*-Antigene verläuft wie folgt: *Treponema pallidum* wird aus infizierten Kaninchenhoden gewonnen, und die genomische DNA wird durch eine modifizierte Proteinase K/ SDS-Methode isoliert. Die Genamplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgt mit Hilfe spezifischer Primer (Tabelle 1), so daß Restriktionsendonukleaseschnittstellen (*Bam*HI am 5'-Ende, *Sal*I am 3'-Ende) den Einbau der PCR-Amplifikate in die entsprechende Klonierungsstelle des Vektors pQE-30 ermöglichen.

- 15 Tabelle 1 am Ende der Beschreibung zeigt die Klonierungsprimer für die Genamplifizierung der *Treponema pallidum*-Antigene. In der Tabelle sind in fett die Schnittstelle der Restriktionsendonuklease wiedergegeben, kursiv ist die erste vom PCR-Amplifikat kodierte Aminosäure dargestellt (TGT und TGC sind Zystein, CAG ist Alanin und AAG ist Lysin); das Stopp-Codon ist unterstrichen markiert.

- 25 Die PCR wird in einem Endvolumen von 100 µl durchgeführt und enthält 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl pH 8.3, 1,5 mM MgCl₂, Desoxyribonukleotid-Mix (je 200 µM für ATP, GTP, TTP, CTP), je 100 pmol Klonierungsprimer 1 und 2 (Tabelle 1), 1 ng chromosomale *Treponema pallidum*-DNA bzw. 20 ng Plasmid-DNA mit inserierter *Treponema pallidum*-Gensequenz und 1 Einheit Taq-Polymerase (Pharmacia). Der Ansatz wird mit 100 µl Öl überschichtet (Mineral Oil, SIGMA). Die Reaktionen werden im Thermocycler (Landgraf) durchgeführt
- 30 (Denaturierung 60 s, 94 °C, Annealing 120 s, 50 °C, Polymerisation 120 s, 72 °C). Die Größe der PCR-Produkte werden in der Agarosegelelektrophorese überprüft.

Restriktion und Ligation von Vektoren und PCR-Produkten erfolgen nach Standardprotokoll der Hersteller der Enzyme. Die In-Gel-Ligation wird nach dem Protokoll des Herstellers der niedragschmelzenden Agarose durchgeführt (Seaplaque GTG, FMC). Beim Einsatz der Restriktionsendonukleasen, der alkalischen Phosphatase und der T4 DNA-Ligase (Pharmacia) werden die Hinweise des Herstellers berücksichtigt. Für die Reinigung von DNA-Fragmenten wird das Glass Max System (Gibco BRL) verwendet. Der korrekte Einbau der PCR-Amplifikate wird durch Molekulargewichtsbestimmung in der Agarosegelelektrophorese und durch DNA-Teilsequenzierung bestätigt.

10

Es folgt die Expression der *Treponema pallidum*-Antigene. Durch die angewendete Klonierungsstrategie unter Verwendung des Plasmidvektors pQE-30 werden Expressionssysteme für rekombinante *Treponema pallidum*-Antigene erhalten, die wie folgt charakterisiert sind: Auf ein Promotor-Operator-Element, das aus dem Promotor des Bakteriophagen T5, zwei *lac*-Operatorsequenzen und einer synthetischen Ribosomen-Bindungsstelle besteht (Stüber et al., in: Lefkovits / Pernis, Immunological Methods Volume IV, 121-152 (1990)), folgen Startcodon, Sequenzen für 6 aufeinanderfolgende Histidinreste, ein Polylinker zur Insertion proteincodierender Sequenzen sowie ein vektorcodierter Transkriptionsterminator. Bei Verwendung des Expressionsvektors pQE-30 sind die rekombinanten Proteine durch eine N-terminale Hexahistidinsequenz modifiziert. Der Laktoserepressor zur Kontrolle der Genexpression wird auf dem Plasmid pREP4 codiert, das im Wirtstamm M15 in mehreren Kopien vorliegt und über seine Kanamycinresistenz selektiert wird. Als Induktor der Genexpression dient das synthetische Lactosederivat IPTG.

Figur 2 zeigt Expression und Immunoreaktivität der Fusionsproteine 17 kD-Antigen, 47 kD-Antigen, BMP, TmpA, TmpC. Zur Expression der rekombinanten Antigene werden Bakterien des Stammes M15 mit den entsprechenden rekombinanten Plasmiden angezüchtet und die Genexpression durch Zugabe von 2 mM IPTG in der logarithmischen Wachstumsphase induziert. Nach dreistündiger Weiterinkubation werden die Zellen geerntet, die Fusionsproteine über Ni-NTA-Sepharose isoliert und in der SDS-PAGE aufgetrennt. Für alle Fusionsproteine

30

kann im Coomassie - gefärbten Gel (linke Bildhälfte) jeweils eine distinkte Proteinbande sichtbar gemacht werden.

5 Der Westernblot (rechte Bildhälfte) zeigt bei den entsprechenden Klonen Immunoreaktivität der rekombinanten Proteine 17 kD-Antigen (Spalte 1), BMP (Spalte 2), 47 kD-Antigen (Spalte 3) und TmpA (Spalte 5). Für das TmpC (Spalte 4) kann keine Immunoreaktivität detektiert werden.

10 Für die konstruierten Expressionssysteme mit Ausnahme für das 15 kD-Antigen wird bereits nach einer Stunde eine starke Genexpression nachgewiesen. Für nachfolgende Reinigung werden Kulturen verwendet, die drei Stunden mit 2 mM IPTG induziert werden. Durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung wird das erwartete Molekulargewicht bestätigt und im Westernblot die Reaktivität der rekombinanten Antigene mit Syphilisserum nachgewiesen (Figur 2). Für das 15 47 kD-Antigen, das 17 kD-Antigen, BMP und TmpA ist jeweils eine Bande deutlich erkennbar. Für das 17 kD-Antigen ist eine weitere sehr schwache immunoreaktive Bande mit einem Molekulargewicht von 35 kD sichtbar, die auf eine Dimerbildung zurückzuführen sein könnte. Das TmpC zeigt keine und das 34 kD-Antigen nur eine schwache Immunoreaktivität.

20 Die sechs aufeinanderfolgenden Histidin-Aminosäurereste der rekombinanten Fusionsproteine gestatten eine Reinigung der Antigene nach dem Prinzip der immobilisierten Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (Hochuli et al., J. Chromatogr. 411, 177-184 (1987)). Der verwendete Chelat-Ligand NTA 25 (Nitrilotriacetic acid) hat vier Bindungsstellen, welche vier der sechs möglichen Bindungen des komplexbildenden Nickelions besetzen. Der mit Metallionen beladene Chelat-Ligand (Ni-NTA, Hoffmann-La Roche) ist an Sepharose CL-6B immobilisiert. Die übrigen zwei freien Bindungsstellen des Nickelions reagieren mit dem 6xHistidin-Affinitätsende am N-terminalen Ende des rekombinanten 30 Proteins. Die Elution der rekombinanten Proteine erfolgt durch Protonierung der Histidin-Aminosäurereste im sauren pH-Bereich (etwa bei pH 5.8) und Dissoziation vom Ni-NTA-Liganden. Die Reinigung der rekombinanten *Treponema pallidum*-Antigene wird nach dem Protokoll des Herstellers (QIAGEN, s.o.) aus dem Pellet von 500 ml induzierter Bakterienkultur unter denaturierenden Bedin-

gungen durchgeführt. Die Ausbeute liegt zwischen 5 bis 68 mg Protein / l induzierter Kultur. Die densitometrisch bestimmte Reinheit schwankt von 70 bis 99 %.

- 5 Es wird im folgenden die Bindung von *Treponema pallidum*-Antigen an eine feste Phase und der Nachweis spezifischer Antikörper anhand einiger Beispiele diskutiert.

- 10 Beispiel 1: Adsorptive Bindung von rekombinantem *Treponema pallidum*-Antigen an Mikrotiterplatten und colorimetrischer Enzymimmuntest (col. EIA)

- 15 Mikrotiterplatten mittlerer Bindungskapazität (F-Form, Greiner) wurden 18 Stunden bei 4 °C mit 100 µl Antigen in 0,1 M Bicarbonatpuffer beladen (0,04 M Na₂CO₃, 0,06 M NaHCO₃, pH 9.6). Die Antigenkonzentration betrug 1 µg/ml. Die beladenen Platten wurden dreimal mit 200 µl Waschpuffer (PBS, 0,05 % Tween 20) gespült, um nicht gebundenes Antigen zu entfernen. Anschließend wurde eine einstündige Blockierung der freien Bindungsstellen auf der Plastikoberfläche der Mikrotiterplatte mit 5%igem Magermilchpulver in Waschpuffer durchgeführt, der sich ein dreifacher Waschvorgang anschloß. Danach wurde
20 bei Raumtemperatur eine zweistündige Inkubation mit 100 µl Patientenserum in Waschpuffer in verschiedenen Verdünnungen durchgeführt. Es folgten drei Waschschritte mit jeweils 200 µl Waschpuffer. Ein Anti-human-IgG-AP-Konjugat (γ-kettenspezifisch) wurde nach Angaben des Herstellers (SIGMA) in Waschpuffer verdünnt. Jeweils 100 µl Konjugat wurden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden 200 µl des Enzymsubstrates *p*-Nitrophenylphosphat in 0,2 M Tris (*p*-NPP-Substrattablettenset, SIGMA) zugegeben und bei
25 Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach 30 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 3 N NaOH abgestoppt. Die Extinktion wurde gegen den
30 Substrat-Blank bei einer Wellenlänge von 405 nm im Mikrotiterplattenphotometer Anthos gemessen.

- Zur Testoptimierung wurden Schachbrettiterationen durchgeführt und als Standardbedingungen eine Verdünnung des sekundären Antikörpers von 1:4.000 und des Untersuchungsserums von 1:400 ausgewählt (Figuren 3 und 4). Bei höheren Verdünnungen war eine Verringerung des Quotienten aus Extinktionen eines Sekundärsyphilispoolserums und einem Negativserum (P/N-Quotient) zu verzeichnen. Für das 17 kD-Antigen, das 47 kD-Antigen und das TmpA wurden mit 17.1, 7.4 und 11.7 die höchsten P/N-Quotienten ermittelt. Deshalb wurden diese drei Antigene für einen kombinierten ELISA ausgewählt.
- 10 Figur 4 zeigt als Abszisse die Serumverdünnung, als Ordinate OD bei 405 nm. Gezeigt ist die Abhängigkeit der Extinktionen im colorimetrischen ELISA von der Serumverdünnung nach separater Beladung der Mikrotiterplatten (mit jeweils 1 µg/ml). Ein Negativpool verläuft als unterste Kurve und ist durch rechteckige Kästchen gekennzeichnet, darüber verlaufen die Kurven von (in dieser Reihenfolge) 47 kD - Antigen, TmpA, 17 kD - Antigen sowie nach simultaner Beladung mit diesen drei rekombinanten Antigenen (jedes 1 µg/ml).

Beispiel 2: Adsorptive Bindung von rekombinantem *Treponema pallidum*-Antigen an Mikrotiterplatten und Chemilumineszenz-Enzymimmuntest (CL-EIA).

20

Auf der Basis des ELISA-Light Kit (Tropix Inc., USA), dessen Detektionssystem auf der Chemilumineszenz bei enzymatischer Umsetzung von Dioxetanen (EP 0 275 260 B1) beruht, wurde folgendes Protokoll entwickelt:

- 25 Mikrotiterplatten (Mikrolite®, Dynatech USA) werden unter den in Beispiel 1 genannten Bedingungen beladen (Antigenlösung 1 µg/ml in Bicarbonatpuffer) und nach 18stündiger Inkubation bei 4 °C dreimal gewaschen. (PBS, 0,05 % Tween 20). Nach einstündiger Blockierung (PBS, 0,5 % I-Block [Tropix Inc.]), 0,05 % Tween 20) wird viermal mit Waschpuffer gespült (0,2 % I-Block, 0,05 % Tween 20 in PBS). Die nachfolgende Inkubation mit in Waschpuffer verdünnten Patientenseren erfolgt über einen Zeitraum von einer Stunde. Nach drei Waschschritten schließt sich eine einstündige Inkubation mit 1:2.500 in Waschpuffer verdünntem Anti-human-IgG-AP-Konjugat (γ-kettenspezifisch, SIGMA) an.
- 30

Anschließend wird dreimal in Waschpuffer und zweimal in Assaypuffer (0,1 M Diethanolamin, 1mM MgCl₂, pH 10.0) gewaschen. Danach wird für 10 Minuten mit 100 µl Verstärker/ Substrat inkubiert (Assaypuffer, 10 % Sapphire, 0,2 mM CSPD, [beides Tropix Inc.]). Die Chemilumineszenz wird nach 20 Minuten im Mikrotiterplattenluminometer Lucy1 (Anthos) gemessen.

Zur Testoptimierung werden Schachbrettiterationen durchgeführt und als Standardbedingungen eine Verdünnung des sekundären Antikörpers von 1:2.500 und des Untersuchungsserums von 1:800 ausgewählt.

Figur 5 zeigt die Abhängigkeit der Chemilumineszenzintensität (in Counts per Sekunde, auf der Ordinate aufgetragen) von der Antikörperkonzentration (als Serumverdünnung auf der Abszisse aufgetragen) gegen die einzelnen Antigene und die Antigenkombination TmpA, 47 kD-Antigen und 17 kD-Antigen (geprüft an Verdünnungen des Sekundärsyphilispoolserums). Von oben nach unten zeigen die Kurven die Chemilumineszenz-EIA (CL-EIA) der genannten Antigenkombination, von 17 kD-Antigen, TmpA, BMP, 47 kD-Antigen, 34 kD-Antigen, TmpC und Tp4. Sie ist über 6 Titerstufen nahezu linear. Die entsprechenden Kurven sind als Referenzkurven zur quantitativen Bestimmung von Antikörperkonzentrationen in unbekannten Untersuchungsproben sehr gut geeignet. Der große lineare Bereich zeigt die Überlegenheit des Chemilumineszenz-EIAs für quantitative Antikörperbestimmungen gegenüber dem colorimetrischen Nachweis.

Die Standardverdünnung von 1:800 ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Figur 6 zeigt den Positiv-/Negativquotienten im Chemilumineszenz - EIA aufgetragen auf der Ordinate über der Serumverdünnung auf der Abszisse. Auch hier deutet der Pfeil die Standardverdünnung von 1:800 an. Die Reihenfolge der Kurven ist hier (von oben, gesehen bei 1:800): 17 kD-Antigen - CL - EIA, TmpA, BMP, 47 kD-Antigen, Antigenkombination (wie vor), 34 kD-Antigen, TmpC, Tp4. Dieser Quotient erlaubt weitere Rückschlüsse für den diagnostischen Einsatz der rekombinanten Proteine.

Die Chemilumineszenztests mit Tp4 und TmpC sind jedoch nicht zum Einsatz in der serologischen Syphilisdiagnostik geeignet, da die Antikörperkonzentrationen gemessen an der Höhe der Chemilumineszenz wie auch die P/N-Quotienten (1,5; 2,2) zu niedrig sind. Wegen des vergleichsweise niedrigen P/N-Quotienten von 6,7 ist das 34 kD-Antigen weniger zum diagnostischen Einsatz geeignet. Für das 17 kD-Ag, TmpA, das 47 kD-Antigen und BMP wurden im entsprechenden Chemilumineszenz-EIA die höchsten Chemilumineszenzwerte gemessen. Die P/N-Quotienten lagen bei 94 für das 17 kD-Ag, 35 für das TmpA, 11 für das 47 kD-Ag und 14 für BMP (Serumverdünnung 1:800, Figur 6).

Mit dem 17 kD CL-EIA, dem TmpA CL-EIA, dem 47 kD-Ag CL-EIA und dem BMP CL-EIA und im CL-EIA mit der Kombination aus 17 kD-Antigen, 47 kD - Antigen und TmpA werden Seren von Patienten der verschiedenen Syphilis-stadien untersucht. Die Chemilumineszenzwerte werden dabei auf ein Vielfaches eines mitgeführten negativen Serumpools umgerechnet. Die Ergebnisse sind in Figur 7 dargestellt. Zur qualitativen Auswertung der Tests werden als Grenzwert die dreifache Standardabweichung vom Blutspendermittelwert (n=38) festgelegt.

Die Ergebnisse im Chemilumineszenz-EIA sind in Tabelle 2 am Ende der Beschreibung zusammen mit den Ergebnissen im colorimetrischen Test den Ergebnissen im CMT, dem TPHA-Test und dem FTA-Abs-Test gegenübergestellt. Untersucht wurden Seren von Syphilispatienten mit Primärsyphilis (LI), Sekundärsyphilis (LII), Tertiärsyphilis (LIII), Lues latens (LLa). Die Ergebnisse im colorimetrischen Test (col.EIA) wurden in Extinktionseinheiten, für den chemiluminometrischen Test (CL-EIA) in relativen Einheiten angegeben (als Vielfaches der Chemilumineszenz eines negativen Referenzserums). Seren unterhalb des definierten Grenzwertes (Mittelwert plus drei Standardabweichungen von 37 bis 42 Blutspenderseren) sind markiert. Insgesamt ist eine Befundkorrelation in der Weise vorhanden, daß für Seren mit niedrigem Titer in CMT, TPHA oder FTA-Abs auch niedrige Antikörperkonzentrationen in den Enzymimmuntests nachgewiesen werden. Dies ist besonders deutlich für Seren des latenten Syphilisstadiums. Im BMP CL-EIA liegen 8 von 18 Seren

unterhalb des Grenzwertes, darunter alle untersuchten Seren im latenten Stadium der Syphilis. Für ein serologisches Syphilisscreening ist der isolierte Nachweis von Antikörpern gegen BMP nach den bisher vorliegenden Ergebnissen nicht geeignet. Die hier vorgestellten Erstbefunde lassen jedoch auf eine mögliche Korrelation der Antikörperkonzentrationen zum Krankheitsstadium und/oder der Krankheitsaktivität schließen. Sollte sich dies nach Untersuchung einer größeren Anzahl von Syphilispatienten bestätigen, könnte ein Antikörpernachweis gegen BMP z. B. als Therapiekontrolle diagnostisch verwertbar sein. Unter den 18 untersuchten Syphilisseren sind in den CL-EIAs mit dem 17 kD-Antigen und dem 47 kD-Antigen je zwei und mit TmpA drei Seren negativ. Davon ist ein Serum in allen drei Tests negativ, die anderen negativen Befunde in einem Test mit rekombinantem Antigen sind mit positiven Befunden für die anderen rekombinanten Antigene verbunden. Daraus läßt sich die Schlußfolgerung ziehen, daß eine ausreichende diagnostische Sicherheit nur durch Antikörperbestimmung gegen mehrere rekombinante Antigene zu erreichen ist.

Beispiel 3: Kovalente Bindung von rekombinantem *Treponema pallidum*-Antigen und Chemilumineszenz-Enzymimmuntest

Zur kovalenten Bindung von rekombinanten *Treponema pallidum*-Antigenen an eine feste Phase wurden superparamagnetische Polystyrol-Partikel (DYNA-BEADS M-280 Tosylactivated, DYNAL Norwegen) verwendet. Das Prinzip der kovalenten Bindung ist in den technischen Unterlagen ausreichend beschrieben. Weiterer wesentlicher Bestandteil dieses Verfahrens ist das Prinzip der Separation der Partikel von den jeweiligen Reaktionslösungen durch ein Magnetfeld. Im vorliegenden Beispiel wurden Eppendorfröhrchen mit den Magnetpartikeln in Reaktionslösung zur Phasentrennung in einen Magnetseparator gebracht. Dabei werden die superparamagnetischen Partikel durch das Magnetfeld eines Permanentmagneten an die Wandung gezogen und die Reaktionslösung kann durch Abpipettieren oder Absaugen entfernt werden.

Der Versuch wurde exemplarisch mit dem rekombinanten 17 kD-Antigen durchgeführt. Die Partikel wurden im Magnetseparator vom Transportmedium ge-

trennt, zu 20 mg/ml resuspendiert, mit gleichem Volumen von rekombinantem Protein versetzt und 24 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Reaktionsbedingungen bei der dabei erfolgenden Bindung des rekombinanten Proteins an die Partikel waren 10 mg/ml Partikel, 20 µg/ml rekombinantes Protein in 0,05 M Boratpuffer pH 9,5. Anschließend wurde mit Waschpuffer (PBS, 0,2 % I-Block, 0,05 % Tween 20) dreimal 10 min, einmal 30 min und einmal über Nacht gewaschen, wobei simultan freie Proteinbindungsstellen blockiert wurden. Die beladenen Partikel wurden bei 4 °C aufbewahrt und am Tag des Tests zweimal mit Waschpuffer gewaschen und für die Versuchsansätze portioniert. Für einen Test wurden 0,05 mg Partikel mit 100 µl Patientenserum in einer Verdünnung von 1:800 in Waschpuffer über eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde mit Sekundärantikörper (1:2500 Anti-Human-Alkalische-Phosphatase-Konjugat, γ-kettenspezifisch, SIGMA) über 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurde zweimal in Waschpuffer und zweimal in Diethanolaminpuffer (0,1 M Diethanolamin, 1mM MgCl₂, 0,02 NaN₃, pH 10,0) gewaschen. Nach Resuspendieren der Partikel in 50 µl Diethanolaminpuffer wurden diese in Mikrotiterplatten überführt, die je Kavität 50 µl Verstärker/Substratlösung enthielten. (Endkonzentrationen in 100 µl: 10 % Sapphire, 0,2 mM CSPD, [beides Tropix Inc.]). Die unter Vermittlung der alkalischen Phosphatase entstehende Chemilumineszenz bei der Umsetzung des Substrates wurde im Mikrotiterplattenluminometer Lucy1[®] (Anthos) gemessen. Für das rekombinante 17 kD-Antigen wurden in diesem System ein Poolserum von 73 Blutspendern mit einem Poolserum von Patienten mit Sekundärsyphilis verglichen. Bei einer Integrationszeit von 1 s je Chemilumineszenzmessung wurden als relative Counts für das Syphilispoolserum 1.481.958,5 (10 min nach Reaktionsbeginn), 1.641.317,5 (nach 20 min) bzw. 1.746.169 (nach 30 min) sowie für das Blutspenderpoolserum 7.519,5 (nach 10 min), 9.929,5 (nach 20 min) bzw. 11.629 (nach 30 min) ermittelt. Dies entspricht einem Positiv/ Negativ-Quotienten nach einer Substratinkubation von 10 min von 197, nach 20 min von 165 und nach 30 min von 150. Aus diesen Werten ist ersichtlich, daß offenbar eine geringere unspezifische Bindung von Antikörpern an die feste Phase erfolgt. Dadurch ist die analytische Sensitivität den unter Beispiel 1 und Beispiel 2 vorgestellten Systemen überlegen.

- Der simultane Einsatz rekombinanter Antigene in der serologischen Diagnostik verbessert also die Möglichkeiten. Bei der Serodiagnostik von Infektionskrankheiten ist bei Nachweis verschiedener Antikörperspezifitäten gegen den Erreger prinzipiell eine Verbesserung der Sensitivität gegenüber dem Nachweis von Antikörpern gegen ein einzelnes Antigen möglich. Aus diesem Grund wird z. B. als Bestätigungstest bei der serologischen HIV-Diagnostik ein Westernimmunoblot angewendet. Dabei reagieren Antikörper aus Untersuchungsmaterial mit Erregermaterial, dessen Antigene durch eine Elektrophorese aufgetrennt und auf eine feste Phase überführt wurden. Als sicher positiv gilt der Test, wenn mehrere erregerspezifische Banden reaktiv sind. Zwingend wird der Nachweis von verschiedenen Antikörperspezifitäten zur Diagnosestellung dann, wenn der Antikörpernachweis gegen Einzelantigene nicht bei allen Kranken gelingt.
- 15 Mit der vorliegenden Erfindung wird ein Mischantigen-ELISA vorgestellt, der bei zu geringer Reaktivität des Serums gegen ein oder mehrere Antigene durch Nachweis von Antikörpern gegen die anderen Antigene einen positiven Testausfall ergibt. Bei der Untersuchung von Syphilispatientenseren mit den rekombinanten Antigenen im colorimetrischen System (Beispiel 1), wie auch mit dem Chemilumineszenztest (Beispiel 2) zeigte es sich, daß einzelne Seren im Einzelantigen-ELISA negativ reagieren (Tabelle 2). Ein Serum wies negative Testergebnisse in den Enzymimmuntests mit TmpA, BMP, 47 kD-Antigen und 17 kD-Antigen sowohl im colorimetrischen Nachweissystem als auch im Chemilumineszenznachweis auf. Eine Erklärung gibt der Westernblot mit *Treponema pallidum*-Vollantigen, der nur für Tp4 deutliche Reaktivität zeigte. Stark positiv war für dieses Serum auch ein Chemilumineszenz-ELISA mit rekombinantem Tp4. Da immunologische Kreuzreaktivität des Tp4 zu Hsp60-Proteinen anderer Bakterienspezies bekannt ist, besitzt ein isolierter Antikörpernachweis gegen Tp4 geringen diagnostischen Wert und könnte auch auf eine andere Infektion zurückzuführen sein. Die übrigen Seren mit negativem Testergebnis in einem Einzelantigen-ELISA wiesen jedoch positive Tests mit den anderen getesteten rekombinanten Antigenen auf. Der Mischantigen-ELISA war in diesen Fällen positiv. Dies beweist die Überlegenheit eines Mischantigen-ELISAs mit rekombinanten Antigenen gegenüber Einzelantigen-ELISAs für

einen qualitativen Nachweis der Syphilisinfektion. Die kombinierte Anwendung rekombinanter Antigene zum Nachweis einer Syphilisinfektion stellt damit einen wesentlichen Bestandteil der vorliegenden Erfindung dar.

- 5 Im Einzelantigen-ELISA lagen die gemessenen Counts für hochpositive Seren auf etwa demselben Niveau (Figur 8), so daß die simultane Beladung der Mikrotiterplatten mit den Antigenen mit gleichen Konzentrationen erfolgte. Bei einem Test zum simultanen Nachweis von Antikörpern gegen mehrere rekombinante Antigene kommt es darauf an, daß jedes einen meßbaren Anteil
- 10 am Gesamtsignal hervorruft. Die Effizienz der Bindung der rekombinanten Antigene an die Festphase kann jedoch unterschiedlich sein. Bei der Antigen-Antikörper-Reaktion mit mehreren Antigenen, die am gleichen Träger gebunden sind, könnten kompetitive Effekte ebenfalls eine Rolle spielen. Deshalb wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem rekombinantes Antigen dem Patientenserum
- 15 zugesetzt wurde. Dadurch reagieren die entsprechenden Antikörper mit dem rekombinanten Antigen in Lösung und nicht mit dem festphasegebundenen. Die Effizienz dieser kompetitiven Hemmung wurde für jede Antikörperspezifität im Einzelantigen-ELISA ermittelt und lag zwischen 91 und 99 %. Auf Grund dieses hohen Prozentsatzes konnte im Mischantigen-ELISA der gemessene
- 20 Hemmeffekt näherungsweise zur Abschätzung des CL-Anteils für die AK-Bindung am einzelnen Antigen dienen. Für ein Poolserum von Patienten mit Sekundärsyphilis wurde so im Mischantigen-ELISA (Beladungskonzentration je 1 µg/ml) der Chemilumineszenzanteil durch Antikörper gegen das 17 kD-Antigen zu 52 %, TmpA-Antikörper zu 43 % und Antikörper gegen das 47 kD-Antigen zu
- 25 5 % näherungsweise ermittelt. Der Antikörpernachweis gegen das 47 kD-Antigen erscheint unterrepräsentiert. Da es sich bei dem 47 kD-Antigen um ein spezifisches Antigen von *Treponema pallidum* mit starker Immunogenität handelt, sollte der gewünschte Anteil am Gesamtsignal durch Veränderung der Konzentrationsverhältnisse der rekombinanten Antigene beim Beladen
- 30 verändert und wie beschrieben geprüft werden.

Eine elegante Methode für den simultanen Nachweis der Antikörperspezifitäten stellt die Verwendung von Mikropartikeln dar. Jedes einzelne rekombinante Antigen wird in separatem Ansatz an die Mikropartikel gebunden und im Test mit

Einzelantiseren die Chemilumineszenzwerte ermittelt. Mit den erhaltenen Werten läßt sich ein optimales Mischungsverhältnis der Mikropartikelpräparationen ermitteln, so daß für die größtmögliche Zahl der Syphilispatienten ein Meßergebnis über dem Grenzwert erzielt wird. Wenn Mikropartikel separat mit Antigen beladen und erst nachträglich gemischt werden, sind kompetitive Hemmeffekte sowohl bei der Antigenbindung an die Festphase als auch bei der Antigen-Antikörperreaktion ausgeschlossen. Die Funktionsfähigkeit und Überlegenheit dieses Verfahrensweges ist durch die im Beispiel 2, Beispiel 3 und dem Mischantigen-ELISA (Mikrotiterplattenverfahren) hinreichend nachgewiesen. Das beschriebene Verfahren ist geeignet zur Bindung von Antigenen, Antigenbestandteilen oder auch von Peptiden mit ausgewählten Antigen determinanten an Mikropartikel, Bestimmung von deren diagnostischer Relevanz und deren kombinierter Einsatz für einen qualitativen Test in der Serodiagnostik der Syphilis. Auch in der Diagnostik anderer Infektionskrankheiten ist dieses Verfahren durch entsprechende Evaluierung der diagnostisch relevanten Antigene des betreffenden Erregers möglich.

Das Verfahren, bei dem verschiedene rekombinante Antigene separat an Mikropartikel als feste Phase gebunden in Testsystemen nach diagnostischen Kriterien evaluiert werden, und bei dem dann diese Mikropartikel in einem optimalen Mischungsverhältnis in einem qualitativen serologischen Test eingesetzt werden, ist von besonderem Vorteil.

Die Erfindung betrifft ein immunchemisches Verfahren zum Nachweis und zur Bestimmung von Antikörpern gegen *Treponema pallidum* in Blutserum und anderen Körperflüssigkeiten. Das beschriebene Nachweisverfahren beruht auf dem quantitativen Nachweis von Antikörpern gegen rekombinante Antigene von *Treponema pallidum*, wobei der Nachweis für jedes einzelne Antigen oder deren Kombinationen geführt wird. Das vorgestellte Verfahren erlaubt einen Vergleich der Prävalenz und der Titer von Antikörpern gegen jedes *Treponema-pallidum*-Antigen bei Syphilispatienten gegenüber nichtinfizierten Patienten. Daraus lassen sich Schlüsse zur diagnostischen Relevanz des Antikörpernachweises gegen jedes untersuchte Antigen ziehen. Antikörpertiter für jedes einzelne Antigen hängen vom Krankheitsstadium ab und weisen individuelle Unter-

5 schiede auf. Es wird beschrieben, wie durch kombinierten Einsatz von mehreren rekombinanten Antigenen in einem Testverfahren eine verbesserte diagnostische Sensitivität und Spezifität erreicht werden kann. Das Verfahren des gezielten kombinierten Antikörpermachweises gegen ausgewählte Antigene zur Serodiagnostik der Syphilis ist Bestandteil dieser Erfindung. Entsprechende Testsysteme werden beschrieben. Die Anwendung der beschriebenen Verfahren führt zu einer neuen Generation von Testsystemen zum serologischen Nachweis von Syphilisinfektionen auf der Basis rekombinanter Antigene von *Treponema pallidum*.

Tabelle 1

(Klonierungs- primer 1. 5'→3' 2. 3'→5')	Gen	Primersequenz 1. 5'→3' 2. 3'→5' (komplementär und invertiert)	Schnitt- stelle	Bemerkung (Leadersequenz kodiert für Signalpeptid)
1. 17 kD <i>Bam</i>	<i>lpin17</i>	ATA ATA GGA TCC TGT GTC TCG TGC ACA ACC GTG	<i>Bam</i> HI	1. ohne Leadersequenz
2. 17 kD <i>Sal</i>	"	AGA GAC GTC GAC CTA TTT CTT TGT TTT TTT GAG	<i>Sal</i> I	
1. TmpC <i>Bam</i>	<i>ImpC</i>	TAT TAT GGA TCC TGC TCT AAG AGC GAC AGG CC	<i>Bam</i> HI	1. ohne Leadersequenz
2. TmpC <i>Sal</i>	"	AGA GAC GTC GAC TTA GTT CAT CAT GCG TGC AGA	<i>Sal</i> I	
1. TmpA <i>Bam</i>	<i>ImpA</i>	TAA TAT GGA TCC TGT GCC TCG GGC GCC AAG GAG	<i>Bam</i> HI	1. ohne Leadersequenz
2. TmpA <i>Sal</i>	"	ATG ATA GTC GAC TCA TCG AGA GGC TCC TTC TTC	<i>Sal</i> I	
1. BMP <i>Bam</i>	<i>bmp</i>	TAT TAT GGA TCC CAG TCG GCG CTG CAG CCT ATC	<i>Bam</i> HI	1. ohne Leadersequenz
2. BMP <i>Sal</i>	"	TAT TAT GTC GAC TCA CCA GTC GAG CAC CTT GCC	<i>Sal</i> I	
1. 47 kD <i>Bam</i>	<i>lpin47</i>	TAA GAC GGA TCC TGT GGC TCG TCT CAT CAT GAG	<i>Bam</i> HI	1. ohne Leadersequenz
2. 47 kD <i>Sal</i>	"	TAT TAG GTC GAC CTA CTG GGA CAC TAC CTT CGC	<i>Sal</i> I	
1. 34 kD <i>Bam</i>	<i>lpin29-35</i>	TTA TCT GGA TCC TGC GGG GGC GGT GGA GAG CAT CAG	<i>Bam</i> HI	1. ohne Leadersequenz
2. 34 kD <i>Bgl</i>	"	CGG CTA AGA TCT CTA CCA CTG AGG CCC CTT CCA TTC	<i>Bgl</i> II	
1. 34 kD <i>Bam</i> FL	"	TA CAT GGA TCC AAG AGG GTG AGT TTG CTC GGG AG	<i>Bam</i> HI	1. mit Leadersequenz
1. 15 kD <i>Bam</i>	<i>lpin15</i>	ACCACAGGATCCCTGTTCAATTTAGTTCTATCCCG	<i>Bam</i> HI	
2. 15 kD <i>Sal</i>	"	GAOCGAGTCGACCTACCTGCTAATAATGGCTTCCTT	<i>Sal</i> I	1. ohne Leadersequenz
1. Tp4 <i>Bam</i>	<i>lpin60</i>	CACAGCGGATCCGCGAACGAATTCCTGTTTAAT	<i>Bam</i> HI	
2. Tp4 <i>Sal</i>	"	GAGAGTGCAGCTCAATACATACCTCCCATACC	<i>Sal</i> I	

Tabelle 2

Serum	CMT (Titer)	TPHA (Titer)	FTA-ABS (Titer)	17 kD-Ag col. EIA	17 kD-Ag CLE EIA	TmpA col. EIA	TmpA CLE EIA	47 kD-Ag col. EIA	47 kD-Ag CLE EIA	BMP CLE EIA	3 Ag-Mix 17, 47, Tmp col. EIA	3 Mix 17, 47, Tmp CLE EIA
LI-2	64	5120	5	1,40	15,69	0,92	23,22	1,79	25,5	1,38	1,31	9,09
LI-3	64	5120	10	2,34	24,51	2,42	38,91	2,07	33	27,96	2,14	13,68
LI-4	8	160	5	0,12	1,17	0,86	15,27	0,41	5,4	1,08	0,83	3,63
LI-5	64	20480	80	2,42	19,17	2,78	32,88	2,47	33,6	7,56	2,08	12,27
LI-6	32	40960	160	2,42	20,64	1,62	20,07	1,45	18,9	11,25	2,07	10,92
LI-7	64	5120	80	1,04	24,24	1,57	28,2	0,43	14,88	7,95	2,59	12,21
LI-8	32	2560	160	2,49	19,56	2,62	36,6	1,57	16,35	8,91	2,69	11,52
LI-9	64	655280	320	3,43	24,99	3,03	25,68	2,57	35,64	8,52	3,44	14,31
LI-1	16	327680	5	2,44	19,44	0,24	7,74	0,53	3,48	2,01	1,49	10,35
LI-2	64	20480	160	0,48	4,83	0,59	14,97	0,77	7,53	2,19	1,12	5,46
LI-3	4	81920	5	2,32	19,11	0,58	9,93	0,37	5,25	4,14	1,54	9,48
LI-4	64	163840	5	2,32	17,46	1,76	19,56	1,36	11,85	18,12	1,73	11,79
LI-5/6	64	5120	640	1,84	21,18	2,54	37,5	2,03	41,07	7,59	2,34	12,42
LI-8	32	81920	5	2,32	22,68	2,04	24,99	1,40	24,45	23,04	2,31	13,05
LII	16	10240	5	2,06	17,91	0,48	11,82	0,40	11,37	1,65	1,42	10,74
LIIa-2	1	2560	n.b.	1,53	16,41	0,27	5,37	0,12	1,92	0,86	0,94	4,29
LIIa-3	4	10240	10	2,22	20,28	0,74	9,6	0,68	7,38	0,78	1,34	9,66
LIIa-4	2	2560	5	0,20	1,02	0,19	1,14	0,14	1,26	0,3	0,27	1,41
Reaktive Seren												
				17 kD	17 kD	TmpA	TmpA	47 kD	47 kD	BMP	3 Mix	3 Mix
				16/18	16/18	15/18	17/18	16/18	16/18	10/18	17/18	17/18
Grenzwert (3s-Bereich)				0,25	2,27	0,33	2,8	0,22	2,77	2,43	0,36	3,4

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen *Treponema pallidum*,
5 bei dem eine Auswahl von rekombinanten Antigenen genamplifiziert und kloniert wird,
anschließend diese genamplifizierten und klonierten Antigene in Wirtsvektorsystemen exprimiert und dann gereinigt werden,
danach die gereinigten Antigene einzeln oder in Kombination an eine feste
10 Phase gebunden werden,
danach die an die feste Phase gebundenen Antigene einer Reaktion mit einem auf Antikörper hin zu untersuchenden Material ausgesetzt werden, und
danach die mittels Antigen-Antikörperreaktion gebundenen Antikörper aus
15 dem zu untersuchenden Material mittels eines Detektionssystems qualitativ und/oder quantitativ festgestellt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
20 daß die Auswahl der rekombinanten Antigene zum Nachweisen von Antikörpern gegen *Treponema pallidum* besteht aus 17 kD-Antigen, 47 kD-Antigen und TmpA.
3. Verfahren nach Anspruch 2,
25 dadurch gekennzeichnet,
daß die Auswahl zusätzlich enthält TmpC und/oder BMP und/oder das 34 kD-Antigen und/oder Tp4.
4. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
30 dadurch gekennzeichnet,
daß die codierende DNA für die Auswahl der rekombinanten Antigene durch Polymerasekettenreaktion amplifiziert wird.

5. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die amplifizierte DNA in den Plasmidvektor pQE-30 inseriert und in *E. coli* M15[pREP4] exprimiert wird.
- 5
6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die rekombinanten Antigene affinitätschromatographisch gereinigt werden.
- 10
7. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Bindung der rekombinanten, gereinigten Antigene an die feste Phase durch adsorptive oder kovalente Bindung oder über einen bereits festphase-gebundenen Liganden erfolgt.
- 15
8. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß das zu untersuchende Material Körperflüssigkeit wie Blutserum oder Liquor oder Ascites oder Amnionflüssigkeit ist.
- 20
9. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß zum Nachweis der reagierenden Antikörper sekundäre markierte Antikörper eingesetzt werden.
- 25
10. Verfahren nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß die sekundären markierten Antikörper durch Fluoreszenzfarbstoff, Radioaktivität und/oder Enzyme markiert werden.
- 30

11. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Markierung des Sekundärantikörpers direkt oder indirekt über gebundene Liganden erfolgt.
- 5
12. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Nachweis in dem Detektionssystem colorimetrisch und/oder durch Messung der auftretenden Chemilumineszenz und/oder durch Fluoreszenz- und/oder Radioaktivitätsmessung erfolgt.
- 10
13. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß bei der Bindung der rekombinanten, gereinigten Antigene an die feste Phase mehrere rekombinante Antigene gleichzeitig an die feste Phase gebunden werden.
- 15
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß bei der Bindung der gereinigten rekombinanten Antigene an die feste Phase die Bindung jedes rekombinanten Antigens separat an einer festen Phase erfolgt und die unterschiedlich beladenen festen Phasen dann im Test gemeinsam eingesetzt werden.
- 20
15. Mittel aus rekombinanten Antigenen zur Durchführung eines Verfahrens zum Nachweis von Antikörpern gegen *Treponema pallidum*, bestehend aus 17 kD-Antigen, 47 kD-Antigen und TmpA.
- 25
16. Mittel nach Anspruch 15, zusätzlich aufweisend TmpC und/oder BMP und/oder das 34 kD-Antigen und/oder Tp4.
- 30

1/8

Fig.1



- TpN60
- TpN47 (47kD Antigen)
- TpN44,5(TmpA)
- TpN39(BMP)
- TpN37(FloA)
- TpN34,5(FloB1)
- TpN33(FloB2)
- TpN29-35(34kD Antigen)
- TpN17(17kD Antigen)
- TpN15(15kD Antigen)

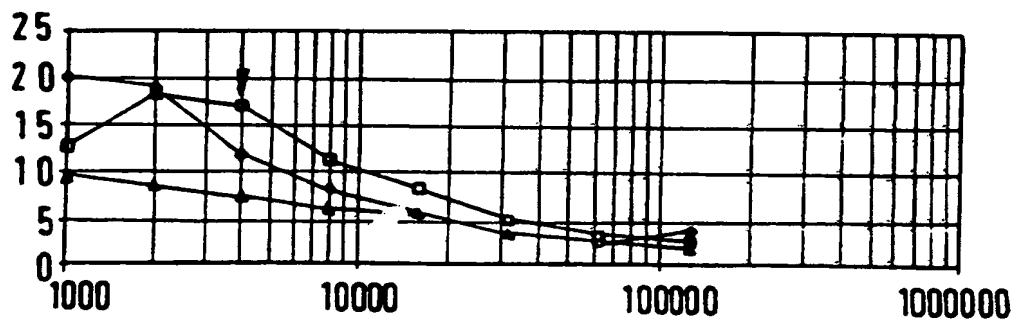
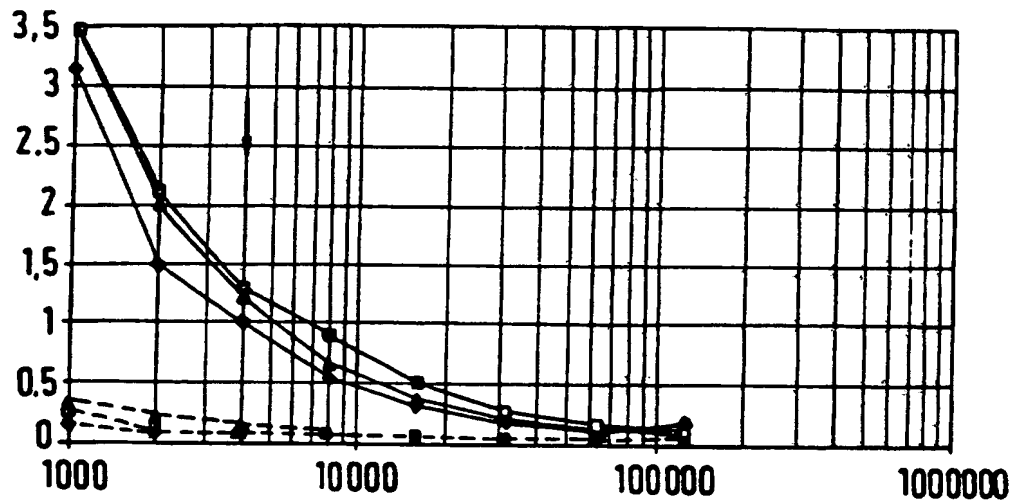
2/8

Fig.2



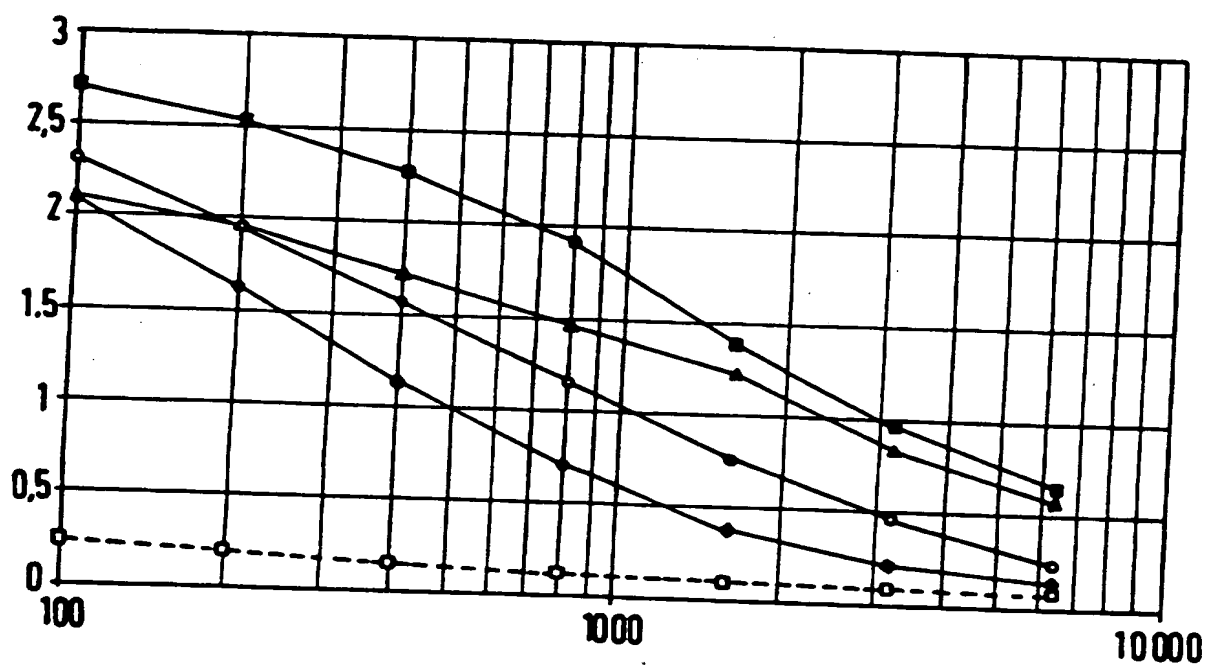
3/8

Fig.3



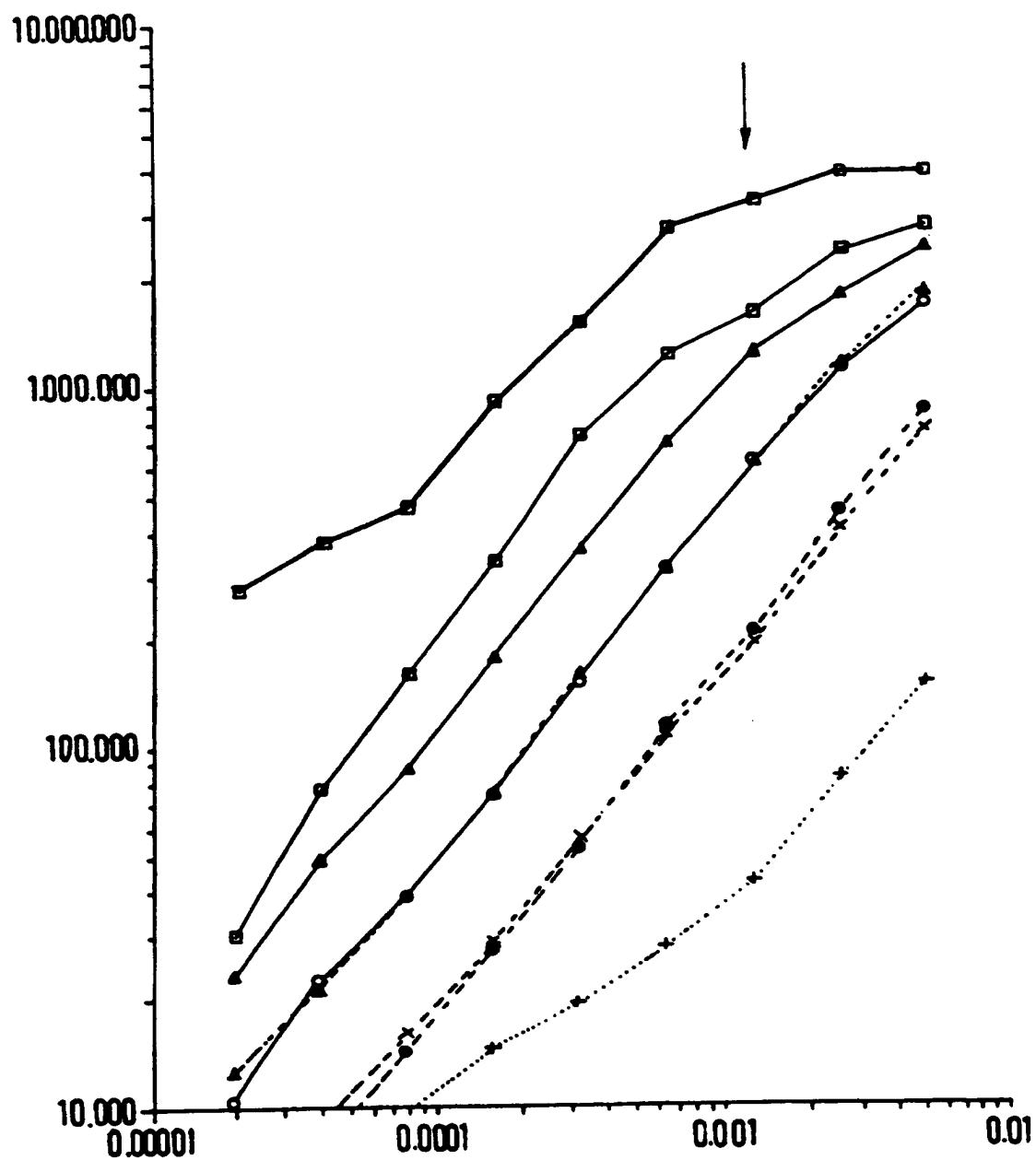
4/8

Fig.4



5/8

Fig.5



6/8

Fig.6

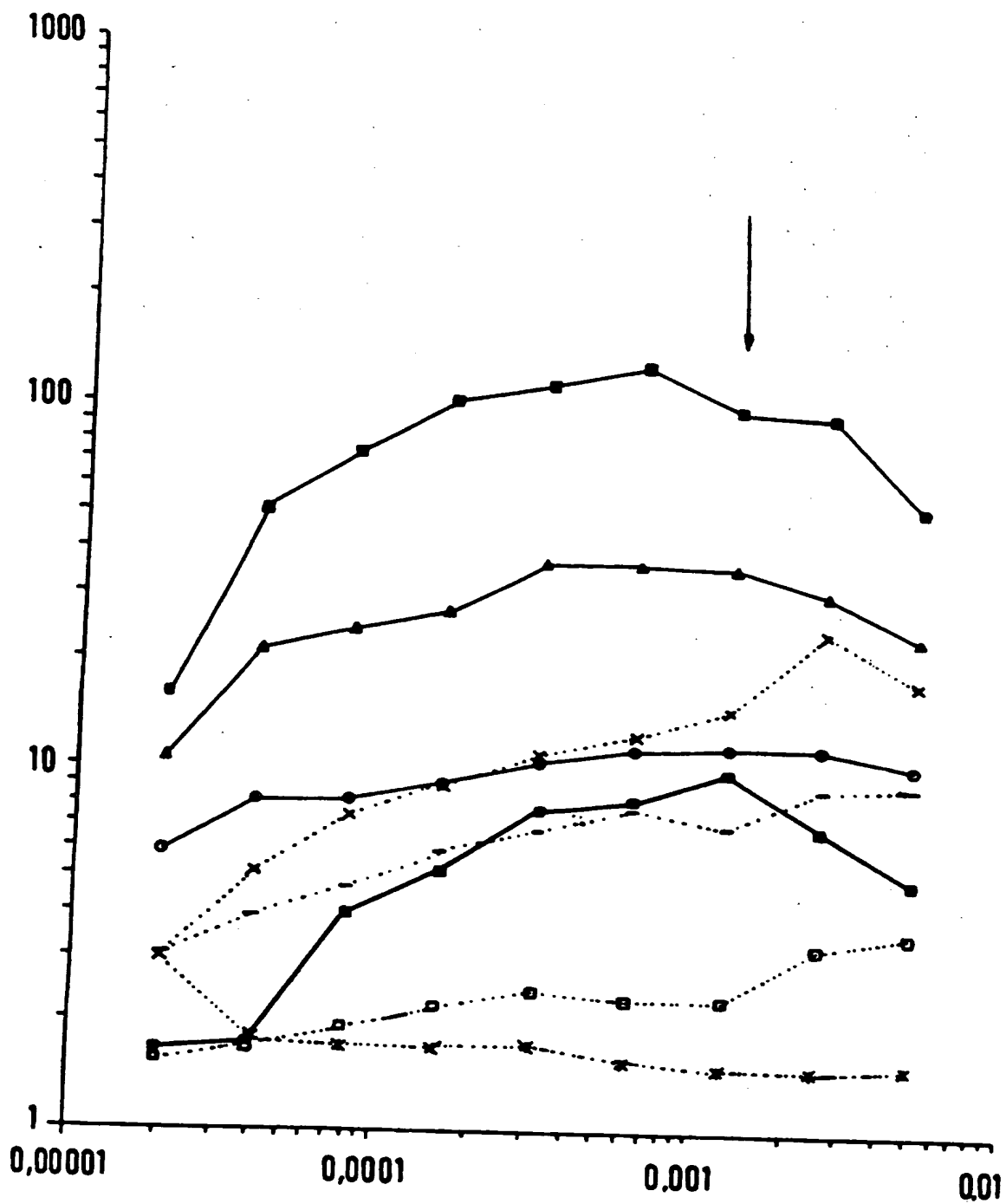
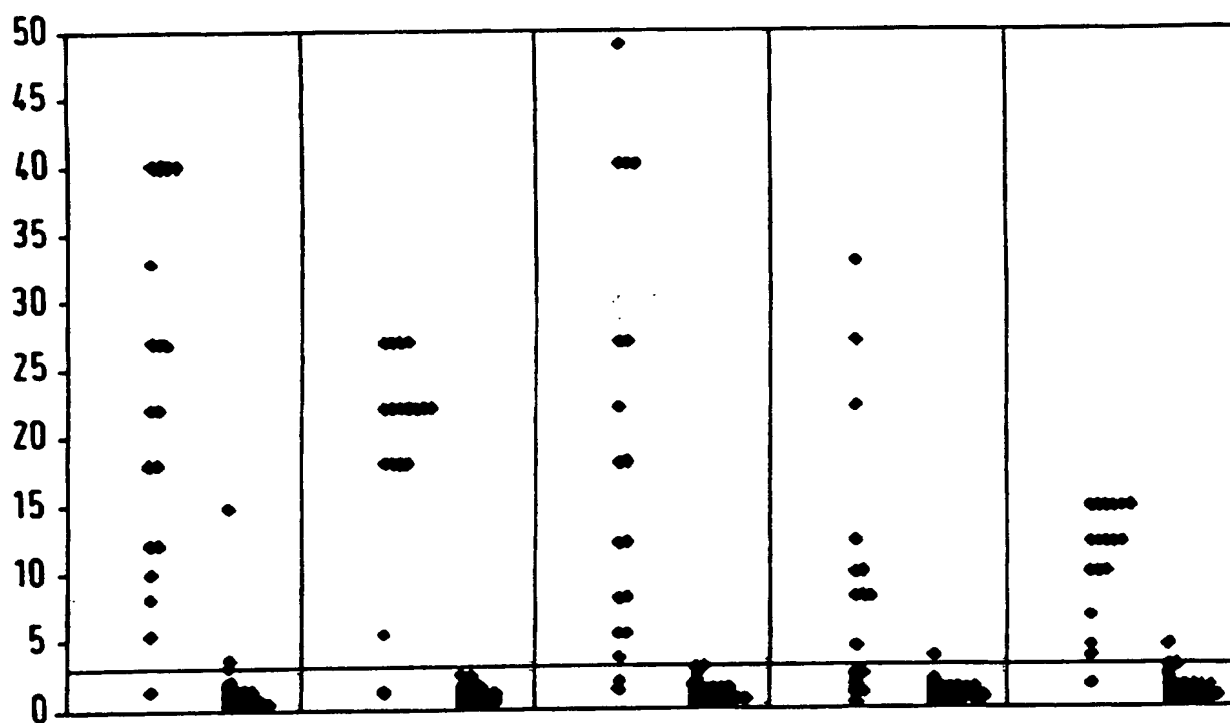
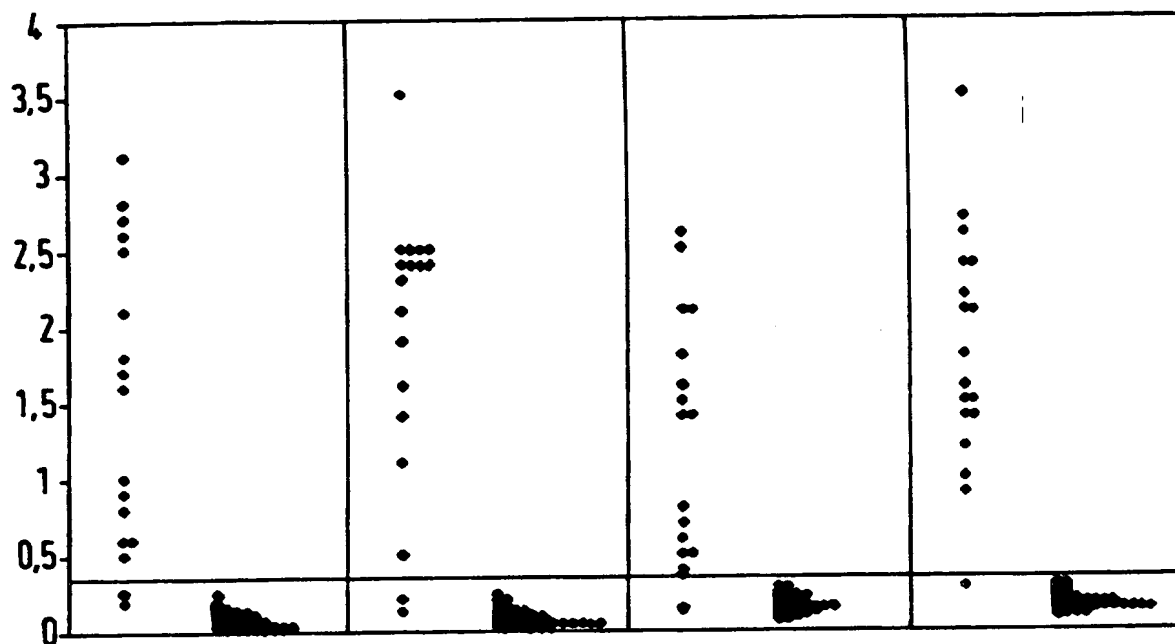
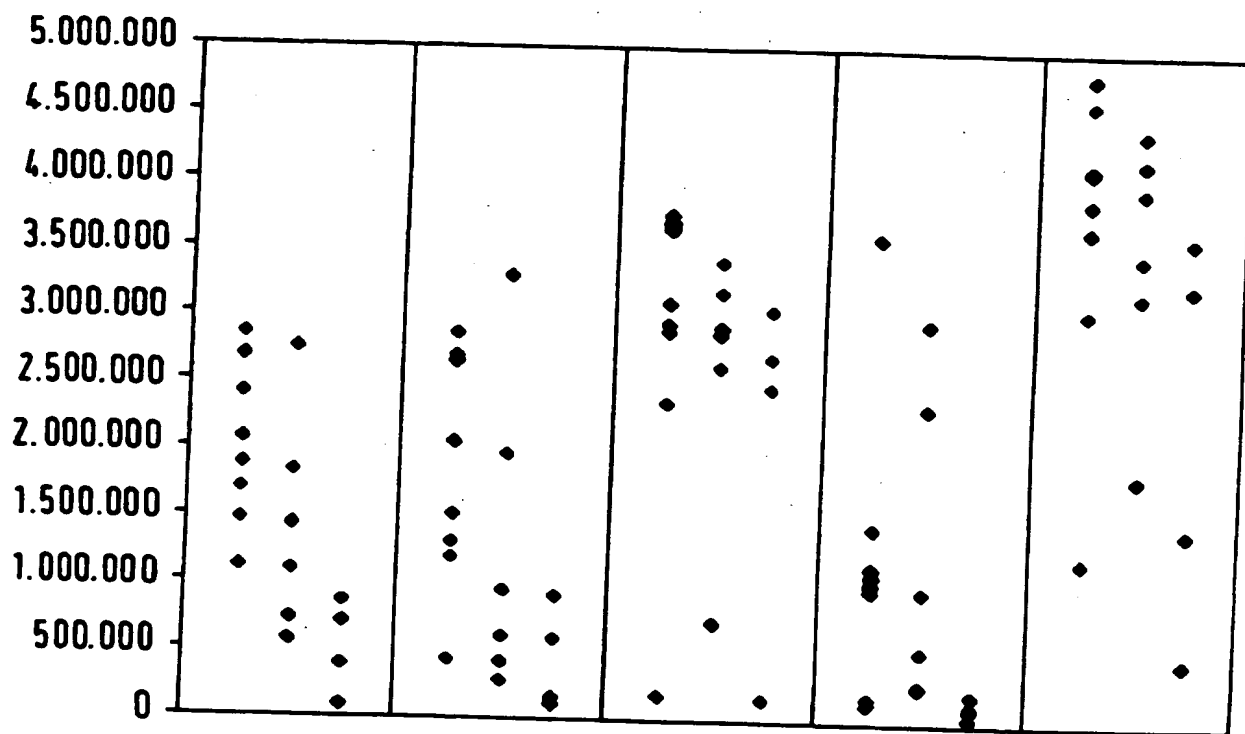


Fig.7



8/8

Fig. 8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

T/EP 96/04249

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N33/571

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	EP 0 686 696 A (INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNO) 13 December 1995 see example 5 see the whole document ---	1
X	EP 0 670 494 A (FUJIREBIO KK) 6 September 1995 see the whole document	1
Y	see abstract; claims; examples ---	2-16
X	WO 88 02403 A (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 7 April 1988 see claim 13	1
Y	see the whole document ---	2-16
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

A document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 February 1997

Date of mailing of the international search report

14-02-1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hoekstra, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

.T/EP 96/04249

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 350 842 A (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 27 September 1994 see column 13	1
Y	--- INFECTION AND IMMUNITY, vol. 61, no. 4, 1993, pages 1202-1210, XP002024431 DARRIN R. AKINS: "LIPID MODIFICATION OF THE 17-KILODALTON MEMBRANE IMMUNOGEN OF TREPONEMA PALLIDUM DETERMINES MACROPHAGE ACTIVATION AS WELL AS AMPHIPHILICITY." see the whole document	2-16
Y	--- EP 0 391 330 A (BEHRINGWERKE AG) 10 October 1990 cited in the application see column 1, line 54 - column 2, line 54 -----	2-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 96/04249

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0686696	13-12-95	AU-A- 2161995 CN-A- 1117526 WO-A- 9533832	21-12-95 28-02-96 14-12-95
EP-A-0670494	06-09-95	US-A- 5578456 JP-A- 7287017	26-11-96 31-10-95
WO-A-8802403	07-04-88	US-A- 4868118 AT-T- 141325 AU-A- 8021487 CA-A- 1336692 CH-A- 676606 DE-D- 3751870 EP-A- 0324774 JP-T- 2500403 US-A- 5350842	19-09-89 15-08-96 21-04-88 15-08-95 15-02-91 19-09-96 26-07-89 15-02-90 27-09-94
US-A-5350842	27-09-94	US-A- 4868118 AT-T- 141325 AU-A- 8021487 CA-A- 1336692 CH-A- 676606 DE-D- 3751870 EP-A- 0324774 JP-T- 2500403 WO-A- 8802403	19-09-89 15-08-96 21-04-88 15-08-95 15-02-91 19-09-96 26-07-89 15-02-90 07-04-88
EP-A-0391330	10-10-90	DE-A- 3911361 AT-T- 119291 AU-B- 645970 AU-A- 5299190 CA-A- 2014067 DE-D- 59008558 ES-T- 2070201 JP-A- 2287258	11-10-90 15-03-95 03-02-94 11-10-90 07-10-90 06-04-95 01-06-95 27-11-90

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

T/EP 96/04249

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 G01N33/571

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 G01N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X, P	EP 0 686 696 A (INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNO) 13. Dezember 1995 siehe Beispiel 5 siehe das ganze Dokument	1
X	EP 0 670 494 A (FUJIREBIO KK) 6. September 1995 siehe das ganze Dokument	1
Y	siehe Zusammenfassung; Ansprüche; Beispiele	2-16
X	WO 88 02403 A (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 7. April 1988 siehe Anspruch 13	1
Y	siehe das ganze Dokument	2-16

-/-

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

3. Februar 1997

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

14-02-1997

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Hoekstra, S

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 350 842 A (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 27.September 1994 siehe Spalte 13 ---	1
Y	INFECTION AND IMMUNITY, Bd. 61, Nr. 4, 1993, Seiten 1202-1210, XP002024431 DARRIN R. AKINS: "LIPID MODIFICATION OF THE 17-KILODALTON MEMBRANE IMMUNOGEN OF TREPONEMA PALLIDUM DETERMINES MACROPHAGE ACTIVATION AS WELL AS AMPHIPHILICITY." siehe das ganze Dokument ---	2-16
Y	EP 0 391 330 A (BEHRINGWERKE AG) 10.Oktober 1990 in der Anmeldung erwähnt siehe Spalte 1, Zeile 54 - Spalte 2, Zeile 54 -----	2-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

.T/EP 96/04249

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-0686696	13-12-95	AU-A- 2161995	21-12-95
		CN-A- 1117526	28-02-96
		WO-A- 9533832	14-12-95
EP-A-0670494	06-09-95	US-A- 5578456	26-11-96
		JP-A- 7287017	31-10-95
WO-A-8802403	07-04-88	US-A- 4868118	19-09-89
		AT-T- 141325	15-08-96
		AU-A- 8021487	21-04-88
		CA-A- 1336692	15-08-95
		CH-A- 676606	15-02-91
		DE-D- 3751870	19-09-96
		EP-A- 0324774	26-07-89
		JP-T- 2500403	15-02-90
		US-A- 5350842	27-09-94
US-A-5350842	27-09-94	US-A- 4868118	19-09-89
		AT-T- 141325	15-08-96
		AU-A- 8021487	21-04-88
		CA-A- 1336692	15-08-95
		CH-A- 676606	15-02-91
		DE-D- 3751870	19-09-96
		EP-A- 0324774	26-07-89
		JP-T- 2500403	15-02-90
		WO-A- 8802403	07-04-88
EP-A-0391330	10-10-90	DE-A- 3911361	11-10-90
		AT-T- 119291	15-03-95
		AU-B- 645970	03-02-94
		AU-A- 5299190	11-10-90
		CA-A- 2014067	07-10-90
		DE-D- 59008558	06-04-95
		ES-T- 2070201	01-06-95
		JP-A- 2287258	27-11-90

THIS PAGE BLANK (USPTO)